

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 10 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450289

研究課題名(和文) 低分子RNA解析を基軸とした渦鞭毛藻の遺伝子発現調節機構に関する研究

研究課題名(英文) Studies about the regulatory mechanisms of gene expression focusing on the small RNA in dinoflagellates

研究代表者

小檜山 篤志 (Kobiyama, Atsushi)

北里大学・海洋生命科学部・准教授

研究者番号：60337988

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：渦鞭毛藻*Alexandrium tamarense*の遺伝子発現調節機構を明らかにするため、低分子RNA(sRNA)の機能解析を中心に行った。その結果、単離した34塩基のsRNAが細胞内の成分と結合する可能性を示すことが出来た。また、本sRNAのゲノムDNAおよび推定前駆体cDNAの部分塩基配列を決定し、同様のsRNAを*A. catenella*から単離することができた。さらに、Argonauteの一部をコードするDNA断片を得ることができたことから、本種もmiRNAを利用した調節機構を有する可能性が示唆された。最後に、渦鞭毛藻遺伝子の推定5'上流域に核内の成分が結合する可能性を示すことが出来た。

研究成果の概要(英文)：We aimed to clarify the regulatory mechanisms of gene expression in a dinoflagellate, *Alexandrium tamarense*, and focused on the functions of small RNA (sRNA). We had already isolated 34-nt sRNA; we investigated the possible existence of molecules that bind to the sRNA to clarify the function of the sRNA of *A. tamarense*, and we revealed the possibility that the sRNA binds to some molecules in the cell. We determined the nucleotide sequences of the peripheral region of the sRNA gene on genomic DNA and predicted the precursor cDNA of the sRNA. We tried to isolate a similar sRNA from *A. catenella* and *Symbiodinium*. As a result, a similar sRNA was isolated from only *A. catenella*. Next, to confirm the existence of Argonaute proteins in *A. tamarense*, we employed PCR and amplified the DNA fragment encoding the PIWI domain of Argonaute. Moreover, we revealed that putative transcription factor binds to the 5' untranscribed region of an *A. tamarense* gene.

研究分野：水産化学，海洋分子生物学

キーワード：渦鞭毛藻

1. 研究開始当初の背景

渦鞭毛藻は海水から淡水域までに生息する植物プランクトンであり、水圏における一次生産者として重要な役割を果たしている。その一方で、渦鞭毛藻には有害・有毒種が含まれ、それらが大量発生することにより、養殖魚介類の斃死や貝類の毒化を引き起こすこともある。したがって、本種の発生の予知や対応策の構築が望まれているが、効果的なものが無いのが現状である。この原因として、本生物種に関する基礎的知見が乏しい事が考えられる。渦鞭毛藻の他生物とは異なる分子生物学的な特徴に、mRNA の 5'末端に Spliced leader (SL)配列と呼ばれる特異的な配列が付加されていること、遺伝子の 5'上流のプロモーター領域には一般的な TATA box が存在しないこと、mRNA の 3'末端側には一般的な poly A 付加シグナルが存在しないことなどが挙げられる。しかしながら、渦鞭毛藻遺伝子の転写や翻訳の調節機構などについては未だ不明のままである。近年、低分子 RNA (sRNA)の機能に関して着目されており、哺乳類から細菌にまでその存在が見出されている。sRNA の主な機能には遺伝子の発現抑制が挙げられ、sRNA が標的とする遺伝子の発現を制御することにより、発生や分化、細胞増殖など様々な生物学的な過程に関与することが報告されている。しかしながら、渦鞭毛藻ではそのような報告は無いのが現状である。

2. 研究の目的

有毒・有害渦鞭毛藻の被害に対する予防策や発生の予測のためにも、渦鞭毛藻の生命現象に関する基礎的知見の蓄積が必要である。しかしながら渦鞭毛藻では細胞増殖機構等の基本的な生物学的知見が乏しい。従って、渦鞭毛藻を理解する上でも、その細胞の根幹を支えている生命現象である、遺伝子の発現制御機構を解明することが重要であると考えられる。そこで本研究では、現在までに不明なまま残されている、渦鞭毛藻の遺伝子発現調節の分子機構を明らかにすることを目的とした。既報の生物種で既に遺伝子の発現調節に重要な役割を果たしていることが報告されてきている sRNA に着目し、我々が有毒渦鞭毛藻 *Alexandrium tamarense* から単離した sRNA の機能解明を試みると共に、転写調節因子などに関する情報の蓄積を試みた。

3. 研究の方法

まず初めに、既に所有している岩手県大船渡湾由来の麻痺性貝毒原因渦鞭毛藻 *Alexandrium tamarense* の 34 塩基の低分子 RNA (sRNA)、クローン AT-1 につき、結合成分の有無を調べるために、本種を f/2 培地中、明期 12 時間、暗期 12 時間の条件下で対数増殖期まで培養した後、細胞を回収した。回収した細胞はプロテアーゼ阻害剤および RNase 阻害剤を

含むトリスバッファー中で破碎し、*A. tamarense* 細胞抽出物を得た。細胞抽出物は、球状タンパク質の分画分子量が 20~8,000 kDa である Sephacryl S-400 HR (GE ヘルスケア)を用いたゲルろ過クロマトグラフィーに供し、約 1 mL ずつのフラクションに回収した。その後、AT-1 の存在を確認するために、各フラクションの溶液をエタノール沈殿で濃縮した試料および DIG 標識した AT-1 オリゴ DNA プローブを用いた RNA ドットプロット解析を行ない、内在 AT-1 の検出を試みた。さらに、*A. tamarense* の抽出物およびビオチン標識した AT-1 の合成 RNA を用い、アフィニティー精製を試みた。

次に、DIG 標識 AT-1 合成 RNA につき、RiboTrap Kit (MBL 社製)で抽出した細胞抽出物および核抽出物を用いたゲルシフトアッセイを行った。この時、sRNA のクローン、AT-1 の他に 35 塩基の sRNA クローン、AT-5 についても DIG 標識合成 RNA を用いて結合成分の有無を調べた。

また、他の渦鞭毛藻における sRNA の存在を調べるために、*A. tamarense* の近縁種である *A. catenella* および、サンゴの共生藻である *Symbiodinium* から sRNA を単離し、AT-1 と同様のものが存在するか否かを調べた。

さらに、AT-1 の生成過程を調べるために、前駆体 cDNA およびゲノムにコードされる領域の単離を PCR 法で試みた。また、*A. tamarense* において、既報の生物種が有する miRNA による遺伝子発現調節機構が存在するか否かを調べるために、既報の生物種で RNA サイレncing に関与するタンパク質として報告されている Argonaute をコードする DNA 断片の増幅を PCR 法で試みた。

最後に、*A. tamarense* における転写因子の存在を調べるために、本研究室で既に単離している遺伝子のプロモーター領域を含むと推測される、推定 5'上流非転写領域および核抽出物を用いてゲルシフトアッセイおよびアフィニティー精製を試みた。

4. 研究成果

A. tamarense の栄養細胞を回収した後、細胞を破碎し、ゲルろ過クロマトグラフィーに供した。1 mL ずつ回収して 280 nm の吸光度を測定した結果、いくつかのピークが得られた。そこで、ピークのフラクションに付き、エタノール沈殿を行なって滅菌蒸留水に溶解させた後、ナイロンメンブレンに吸着させ、ドットプロット解析を用いて AT-1 sRNA の存在を調べた。その結果、ゲルろ過の開始後、カラム体積より少ない液量の溶出画分のフラクションにおいてシグナルが検出された。さらに、シグナルが DNA 由来のものではないことを確認するために、シグナルの得られた試料につき DNase 処理を行い、同様にドットプロット解析を行なった。その結果、シグナルを得ることができた。当該 sRNA の分子量は 11 kDa 程度と推測されることから、ゲルろ過クロマトグラフィーの後半に含まれることが推測されていた。しか

しながらより早い段階のフラクションで検出されたことから、内在 AT-1 には、何らかの成分が結合しているために、より大きな分子量の画分で検出された可能性が考えられた。

そこで次に、*A. tamarense* の細胞抽出物およびビオチン標識した AT-1 合成 RNA を用いた AT-1 結合成分のアフィニティー精製を試みた。結合成分がタンパク質である可能性を考え、AT-1 結合成分につき、SDS-PAGE で検出を試みたものの、タンパク質成分の結合成分を見出すことはできなかった。次に、AT-1 と結合成分との関係を詳細に検討するために、細胞抽出物、核抽出物および DIG 標識した AT-1 合成 RNA を用いたゲルシフトアッセイを試みた。この時、AT-5 についても DIG 標識した合成 RNA を用いて同様に調べた。その結果、AT-5 では細胞抽出物あるいは核抽出物を用いたゲルシフトアッセイにおいて、プローブの分子量の移動はほとんど確認できなかった。それに対し、AT-1 では核抽出物と混合した際にはプローブの位置に変化が生じなかったが、細胞抽出物を用いた場合に、合成 RNA プローブのみの場合と比較して低分子側に移動したプローブのシグナルが認められた。さらに、高分子側でプローブのシグナルが確認される場合と高分子側のシグナルが認められない場合とがあった。本件については結合条件をより詳細に検討する必要性が考えられた。さらに、この分子量が移動したプローブのシグナルは、加熱した細胞抽出物を用いた場合には認められず、さらに DIG 標識プローブに加えて非標識プローブを添加した場合には、プローブのみを電気泳動に供したものと同様の位置および低分子の位置にプローブのシグナルが確認された。これらの結果から、AT-1 に対して RNase が特異的に作用し、低分子成分が生じた可能性も考えられたものの、高分子側へのプローブの移動が確認されたことから、AT-1 に細胞抽出物内に存在する成分が結合した可能性も考えられた。また、AT-5 ではプローブの移動が確認できなかったことから、AT-1 とは結合成分や結合条件が異なり、機能も異なる可能性も推測された。今後、特異的な分解を受けている場合にはその機構を調べ、結合成分が存在する場合にはその単離および同定を行うことにより、AT-1 の機能を明らかにできるものと考えた。また、ゲルシフトアッセイに用いた細胞抽出物を作製する際に、複数のキットを用いて実験を試みたが、本報告書に記載したもの以外では、プローブと結合は認められなかったことから、AT-1 と細胞内成分との結合には、僅かな変化が作用する可能性が考えられた。また、sRNA への結合成分が単離できなかったことから、タンパク質の可能性と共に、RNA 等のタンパク質以外の成分の可能性を検討する必要もあると考えた。

次に、*A. tamarense* の近縁種である *A. catenella* およびサンゴの共生藻として知られる *Symbiodinium* において、AT-1 に類似する sRNA が存在するか否かを確認するために、cDNA クローニングを試みた。その結果、両者において複数の sRNA を得ることができた。AT-1 と塩基配

列が類似するクローンに着目した結果、*A. catenella* においてのみ、類似した塩基配列を有するクローンが得られた。しかしながら本クローンは 32 塩基から成り、AT-1 と比較して 5' 側に 2 塩基の欠損があり、3 塩基の塩基配列が異なるものであった。従って、AT-1 は *Alexandrium* 属の近縁種に存在し、*A. tamarense* および *A. catenella* 間で一致した塩基配列が機能に重要である可能性、あるいは本塩基配列の差異が種の差異を示している可能性も考えられた。

さらに、AT-1 のゲノム DNA 上からの転写に始まる生成過程を調べるために、ゲノム上の塩基配列および前駆体 cDNA の塩基配列の決定を試みた。まず初めに、ゲノム DNA 上に存在する AT-1 の塩基配列の決定を試みた結果、約 500 b の塩基配列を決定することができた。本 DNA 断片に存在する AT-1 の相同配列は、3' 末端のアデニン塩基を欠いているものの、決定した領域は 5' 上流約 80 b および 3' 下流約 390 b を含む可能性が推測された。一方、cDNA を対象に行ったものでは、約 200 b の塩基配列を決定することが出来た。本配列は AT-1 の 3' 末端に存在する 5 つのアデニン以降に複数のアデニンが連なり poly A tail を形成すると推測されるものであった。これらの決定した cDNA およびゲノム DNA の塩基配列を比較した結果、相同領域は完全に一致した。したがって、本塩基配列が AT-1 をコードしているゲノム DNA 領域および mRNA のものである可能性が高いと推測され、AT-1 ゲノム DNA 上から転写された後、前駆体の状態を経て成熟 AT-1 が生じると推測されたが、より詳細な検討が必要と思われた。

さらに、既報の生物種で RNA サイレンシングに参与するタンパク質として報告されている Argonaute をコードする DNA 断片の増幅を試みた。その結果、RNA 結合領域として知られる PIWI 領域をコードする DNA 断片を得ることが出来た。さらに、本 DNA 断片を DIG 標識し、対数増殖期および定常期まで培養した *A. tamarense* より抽出した全 RNA を対象に RNA ドットプロット解析を試みたが、シグナルを得るに至らなかった。したがって、本種も miRNA を介した遺伝子発現調節機構を有しているものの、mRNA 量は少ない可能性が示唆された。また、RNA ドットプロット解析におけるハイブリダイゼーションの温度や洗浄条件の検討などを行なう必要性も考えられた。

最後に、*A. tamarense* の転写因子を解析するために、本研究室で既に単離している交配型特異的に発現する遺伝子の推定 5' 上流非転写領域を用いたゲルシフトアッセイを行った。その結果、核抽出物と混和させて電気泳動に供した際に、プローブのシグナルが高分子側に移動したことから、プローブとして使用した領域に転写因子が結合したものと推測された。さらに、転写因子を同定するためにアフィニティー精製を試みたものの、SDS-PAGE ではバンドが確認できなかった。したがって、より多くの細胞およびプローブを用いて精製を試みる必要性が考えられた。

以上の結果から, *A. tamarense* にも既報の生物種と同様に, miRNA を介した遺伝子発現調節機構を有する可能性を示すことができた. また, 我々が単離した sRNA に何らかの成分が結合する可能性が示唆されたことから, 既報の miRNA 等と同様に遺伝子の発現調節に関与する可能性が考えられた. 今後, sRNA や転写因子についてより詳細に解析することにより, これまで不明な点が多く残されていた渦鞭毛藻における遺伝子発現調節機構の解明に繋がるものと考えられた.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

小檜山 篤志, 石橋陽, 山田雄一郎, 緒方武比古, 渦鞭毛藻 *Alexandrium catenella* における低分子 RNA の解析, 平成 27 年度日本水産学会秋季大会, 2015 年 9 月 22 日 ~ 2015 年 9 月 25 日, 宮城県仙台市 東北大学川内北キャンパス.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小檜山 篤志 (KOBİYAMA, Atsushi)
北里大学・海洋生命科学部・准教授

研究者番号: 60337988

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし